

Pengaruh isoflavone genistein dan daidzein ekstrak tokbi (Pueraria lobata) strain Kangean terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas Rattus Novergicus Wistar hipoestrogenik

I.W.A. WIYASA*
E. NORAHMAWATI**
SOEHARTONO***

*Divisi FER Laboratorium Obstetri dan Ginekologi

**Laboratorium Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

RSU Saiful Anwar Malang

***Divisi FER Laboratorium Obstetri dan Ginekologi

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

RSU Dr. Soetomo Surabaya

Tujuan: Membuktikan pengaruh pemberian isoflavone genistein dan daidzein (IGD) ekstrak tokbi (Pueraria lobata) strain Kangean terhadap jumlah osteoblas (OBL) dan osteoklas (OKL) Rattus novergicus Wistar hipoestrogen.

Bahan dan cara kerja: Penelitian eksperimental ini diawali dengan studi pendahuluan untuk menentukan konsentrasi IGD dalam ekstrak tokbi dan membuat model tikus hipoestrogen. Menggunakan 28 tikus betina, 6 tikus normal sebagai kelompok pertama dan 22 tikus hipoestrogen dibagi menjadi 4 kelompok sebagai kelompok 2, 3, 4, dan 5. Kelompok tikus hipoestrogen terdiri dari 6 tikus ovariectomi (OVX), 5 tikus OVX diberi IGD (OVX + IGD) 15 mg/kg BB/hari, 5 tikus OVX + IGD 30 mg/kg BB/hari, dan 6 tikus (OVX + IGD) 60 mg/kg BB/hari. Semua kelompok diterapi selama 21 hari. Parameter yang digunakan adalah jumlah OBL dan OKL.

Hasil: Satu ml ekstrak Pueraria lobata mengandung 282,53 ppm IGD dengan komposisi 231,11 ppm daidzein dan 51,41 ppm genistein. Didapatkan perbedaan bermakna jumlah OBL dan OKL antara kelompok OVX dan OVX + IGD pada semua dosis ($p < 0,05$). Jumlah OBL terbesar dan OKL terkecil terdapat pada kelompok OVX + IGD 30 mg/kg BB/hari.

Kesimpulan: IGD dari ekstrak Pueraria lobata dapat meningkatkan OBL dan menurunkan OKL pada semua dosis, terutama dosis 30 mg/kg BB/hari.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2008; 32-3: 148-52]

Kata kunci: isoflavone, genistein, daidzein, tokbi, osteoblas, osteoklas, hipoestrogen.

Objective: To determine the effect of isoflavone genistein and daidzein of tokbi (Pueraria Lobata) of Kangean strain's extract to the number of hipoestrogenic Rattus Novergicus's osteoblast and osteoclast.

Material and methods: The design of this study was experimental. The research started with the preliminary study to determined isoflavone genistein and daidzein (IGD) concentration in tokbi extract and to make hipoestrogenic rats model. This study used 28 female rats; 6 rats were normal rats as first group and 22 rats were hipoestrogenic rats as 2nd, 3rd, 4th, and 5th groups. All of the 22 hipoestrogenic rats were divided into 4 groups. They were 6 rats of ovariectomized (OVX) group, 5 rats of OVX by giving tokbi extract containing isoflavone of 15 mg/kg BW/day (OVX + IGD), 5 rats of OVX + IGD of 30 mg/kg BW/day, and 6 rats of OVX + IGD of 60 mg/kg BW/day. All groups were treated for 21 days. The numbers of osteoblast (OBL) and osteoclast (OCL) were used as parameters.

Result: One ml Pueraria lobata extract contained 282.53 ppm of IGD with the composition of 231.11 ppm of daidzein and 51.41 ppm of genistein. A significant difference was found in the amount of OBL and OCL between OVX and OVX + IGD groups at all doses ($p < 0.05$ of each). The highest number of OBL and the lowest number of OCL were found in OVX + IGD groups of 30 mg/kg BW/day.

Conclusion: IGD of Pueraria lobata extract could increase OBL and decrease OCL at all doses, particularly the 30 mg/kg BW/day dose of IGD.

[Indones J Obstet Gynecol 2008; 32-3: 148-52]

Keywords: isoflavone, genistein, daidzein, tokbi, osteoblast, osteoclast, hipoestrogen.

PENDAHULUAN

Kejadian osteoporosis pascamenopause meningkat akibat produksi estrogen endogen menurun. Osteoporosis ditandai oleh penurunan massa tulang dan kerusakan mikro arsitektur sehingga menjadi rapuh dan mudah patah. Hal ini merupakan akibat proses resorpsi tulang (peran osteoklas) yang melebihi aktivitas formasi tulang (peran osteoblas).¹

Osteoporosis merupakan masalah kesehatan dunia. Sebagian besar kasus osteoporosis melibatkan perempuan pascamenopause. Menurut WHO diperkirakan 15% dewasa muda kulit putih mengalami osteopenia dan kira-kira 0,6% mengalami osteoporosis.² Penelitian di Jawa Timur mendapatkan angka kejadian osteoporosis 24%, sedangkan di Jakarta 26%. Indonesia sampai saat ini belum mempunyai data pasti. Diperkirakan kejadian osteoporosis pas-

camenopause di Indonesia pada tahun 2001 sekitar 4 juta.^{3,4}

Sampai saat ini pilihan pertama untuk pencegahan dan pengobatan ketidakseimbangan resorpsi dan formasi tulang adalah terapi sulih hormon (TSH) estrogen. Namun penggunaan TSH estrogen sintetik dapat menimbulkan efek samping baik subjektif maupun objektif, serta risiko kanker payudara dan endometrium.^{1,5} Selain diperlukan pemantauan yang cermat saat terapi maupun pascaterapi, nilai jual sediaan hormon estrogen relatif mahal untuk pemakaian jangka panjang.

Kesenjangan ini harus diupayakan penanganannya melalui penemuan sediaan yang berkhasiat serupa estrogen alami, cukup aman pemakaiannya, terjangkau oleh masyarakat banyak dan relatif dapat dikonsumsi dalam jangka waktu lama. Sediaan tersebut terdapat pada tumbuh-tumbuhan yang disebut kelompok fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan komponen tumbuhan yang memiliki aktivitas biologi dan struktur molekul menyerupai 17β estradiol. Dapat secara langsung berikatan dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen endogen, sehingga dapat memberikan efek estrogenik maupun anti estrogenik. Tiga unsur utamanya adalah isoflavone, *caumenstan*, dan *lignan*.^{6,7,8}

Sumber utama dari isoflavone adalah tanaman polong-polongan (*leguminacea*) terutama kedelai. Unsur utama isoflavone adalah genistein dan daidzein. Studi terbaru membuktikan isoflavone merupakan *selective estrogen receptor modulator* (SERM) karena dapat bersifat sebagai estrogen pada jaringan tertentu seperti tulang dan bersifat sebagai anti-estrogen pada jaringan lainnya (payudara dan uterus).^{9,10,11}

Kelompok studi fitoestrogen dari Perkumpulan Menopause Indonesia (Permi) Malang telah berhasil melakukan isolasi isoflavone dari kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), bengkoang (*Phacellanthus prostratus*), dan tokbi (*Pueraria lobata*) atau kudzu root dengan hasil konsentrasi isoflavone daidzein (D) dan genistein (G) tertinggi dalam satuan mg/100 g *dry weight* pada kulit *Pueraria lobata* (D 892,6; G 1106,4) yang dapat dikembangkan sebagai bahan pembuatan makanan fungsional dan fitofarmaka.¹²

Sampai saat ini pengaruh isoflavone genistein dan daidzein terhadap jumlah osteoblas (OBL) dan osteoklas (OKL) masih belum jelas, padahal sel tersebut sangat berperan dalam proses *remodelling* tulang. Keseimbangan proses tersebut ditentukan oleh aktivitas kedua sel ini. Bila aktivitas sel OKL melebihi aktivitas sel OBL maka dapat menimbulkan osteoporosis.^{1,5}

Berdasarkan kesenjangan di atas, dilakukan penelitian eksperimental pengaruh ekstrak tokbi (*Pueraria lobata*) pada hewan coba *Rattus novvergicus* Wistar terhadap perubahan jumlah OBL dan OKL.

BAHAN DAN CARA KERJA

Studi pendahuluan

Dua studi pendahuluan telah dilakukan untuk menentukan konsentrasi IGD dalam ekstrak tokbi (*Pueraria lobata*) strain Kangean dan model tikus hipoestrogenik dengan ovariektomi.

- Ekstraksi dilakukan dengan metode Figallo (2002) menggunakan metanol 80%. 375 mg tepung daging umbi dan kulit kering *Pueraria lobata* dididihkan dalam 1.500 ml metanol 80%. Dilakukan maserasi, diaduk dengan *shaker* selama 4 jam dan diendapkan selama 24 jam. Filtrat yang terbentuk diambil dan ekstraksi diulang sebanyak 3 kali sampai didapatkan larutan ekstraksi ketiga berkurang intensitas warna kuningnya dibanding ekstraksi pertama. Jumlah ekstraksi yang dihasilkan kira-kira 10% dari volume pelarut. Selanjutnya dilakukan penguapan dengan *rotary evaporator* pada suhu 30° C sehingga didapatkan hasil ekstrak yang pekat. Standar yang akan digunakan untuk pemeriksaan kadar genistein dan daidzein dalam ekstrak *Pueraria lobata* adalah isoflavone bentuk aglikon yaitu genistein dan daidzein, sehingga hasil ekstraksi terlebih dahulu harus dihidrolisis dengan asam.¹³ Penentuan kadar genistein dan daidzein dalam hasil ekstrak dilakukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).¹⁴
- Ovariektomi (OVX). OVX dilakukan menurut metode Ingle DJ dan Grith JQ (1971) yang dimodifikasi (1971).¹⁵ OVX dilakukan menurut metode Ingle DJ dan Grith JQ (1971) yang dimodifikasi. Dilakukan eksplorasi terhadap 6 ekor tikus *Rattus Novvergicus*, dibagi 3 kelompok, kelompok I: kontrol (2 ekor), kelompok II: dibunuh 2 minggu pasca OVX (2 ekor) dan kelompok III: dibunuh 4 minggu pasca OVX (2 ekor). Tikus dibius dengan injeksi ketalar intramuskular 40 mg/kg BB. Dilakukan OVX bilateral. Untuk memastikan kondisi hipoestrogen, setelah 2 dan 4 minggu uterus ditimbang, dilakukan *smear* vaginal untuk melihat indeks maturasi epitel vaginal dan pemeriksaan estradiol serum.

Studi pendahuluan analisis kadar isoflavone genistein dan daidzein dilakukan di lab. Uji Kualitas Air Perum Jasa Tirta I Malang tanggal 8 April sampai 22 Juni 2004. Pembuatan model *Rattus novver-*

gicus Wistar hipoestrogen dan ekstraksi sampel *Pueraria lobata* dilakukan di lab. Farmakologi dan lab. Biomedik FK Universitas Brawijaya tanggal 22 Juli sampai 5 November 2004. Sampel adalah 28 *Rattus novergicus* strain Wistar betina usia 8 sampai 10 minggu, berat 100 sampai 120 g.

Tikus diaklimatisasi selama 5 hari di laboratorium standar dengan diet *nonpurified*. Lalu tikus dibagi menjadi 5 kelompok melalui *sampling* acak lengkap: Kelompok 1: kontrol normal (N), kelompok 2: kontrol dengan ovariectomi (OVX), kelompok 3: OVX + IGD 15 mg/kg BB/hari per oral, kelompok 4: OVX + IGD 30 mg/kg BB/hari per oral, kelompok 5: OVX + IGD 60 mg/kg BB/hari per oral. Masing-masing kelompok ditempatkan dalam kandang tersendiri.

IGD diberikan dengan sonde lambung selama 21 hari. Hari ke-22 tikus dimatikan, dilakukan pengambilan tulang femur dan pengecatan HE setelah preparasi paraffin blok. Penghitungan OBL dan OKL dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x dan dilakukan analisis data.

Data dianalisis dengan uji ANOVA, dilanjutkan uji perbandingan berganda LSD dan uji regresi. Uji statistik dikatakan bermakna bila $p < 0,05$. Proses penghitungan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak komputer program SPSS seri 11.0.

HASIL

Studi pendahuluan

- Ekstraksi tokbi.** 100 ml ekstrak mengandung 28.252,7 ppm total *isoflavone genistein daidzein* dengan komposisi 23.111,4 ppm *daidzein* dan 5.141,3 ppm *genistein*.
- OVX.** 2 minggu pasca-OVX tikus sudah dalam kondisi hipoestrogen ditandai oleh kadar estradiol rendah (< 9 pg/ml) dengan teknik *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), gambaran vaginal *smear* didominasi oleh sel epitel parabasal

dan intermedier mirip kondisi diestrus, serta uterus atropi ditandai dengan berat uterus dan tebal endometrium berkurang.

Selanjutnya digunakan tikus yang telah dilakukan OVX selama 2 minggu sebagai model hipoestrogenik.

Studi utama:

Tabel 2. Pengaruh IGD terhadap jumlah OBL

Kelompok Perlakuan	N	Jumlah OBL			Analisis
		\bar{x}	\pm	SD	
Normal	6	29	\pm	12	Anova (nilai $p = 0,000$)
OVX + IGD 0 mg/kg BB/ hr	6	47	\pm	15	
OVX + IGD 15 mg/kg BB/ hr	5	87	\pm	18	
OVX + IGD 30 mg/kg BB/ hr	5	90	\pm	17	
OVX + IGD 60 mg/kg BB/ hr	6	86	\pm	14	

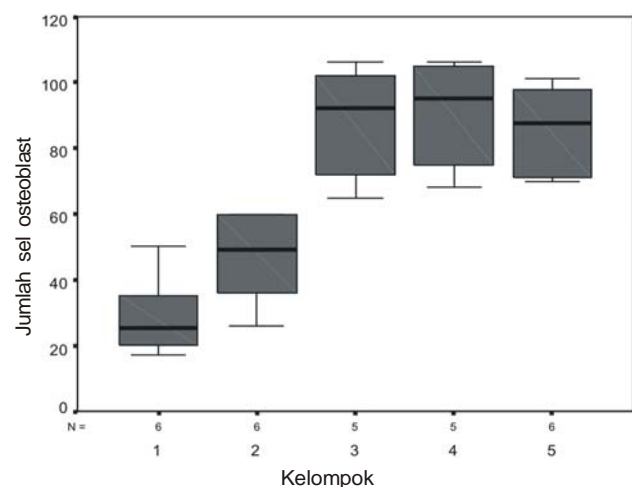


Diagram 1. Diagram Box plot untuk jumlah OBL

OBL kelompok OVX + IGD lebih tinggi dari kelompok lain.

Tabel 1. Efek OVX terhadap Kadar Estradiol, Gambaran *Pap-smear*, Berat Uterus, dan Tebal Endometrium.

No.	Perlakuan	n	Kadar estradiol (pg/ml)	Kadar FSH (mIU/ml)	Gambaran <i>Papsmear</i>	Rerata Berat Uterus (gram)	Rerata Tebal Endometrium (mm)
1.	Kontrol normal	2	20,05 9,94	$< 0,10$	Dominasi epitel superfisial Dominasi epitel parabasal dan intermedier	1,1740	1
2.	Pasca OVX 2 minggu	2	< 9	$< 0,10$	Dominasi epitel parabasal dan intermedier	0,5477	0,5
3.	Pasca OVX 4 minggu	2	< 9	$< 0,10$	Dominasi epitel parabasal dan intermedier	0,2714	0,3

Tabel 3. Kesimpulan uji perbandingan berganda LSD jumlah OBL

Perbandingan kelompok	P value	Kesimpulan
1 vs 2	0,050	Berbeda nyata
1 vs 3	0,000	Berbeda nyata
1 vs 4	0,000	Berbeda nyata
1 vs 5	0,000	Berbeda nyata
2 vs 3	0,000	Berbeda nyata
2 vs 4	0,000	Berbeda nyata
2 vs 5	0,000	Berbeda nyata
3 vs 4	0,805	Tidak berbeda nyata
3 vs 5	0,866	Tidak berbeda nyata
4 vs 5	0,670	Tidak berbeda nyata

Berdasarkan Tabel 3, disimpulkan:

1. terdapat perbedaan bermakna antara rerata jumlah OBL kelompok normal dengan kelompok OVX dan OVX + IGD.
2. terdapat perbedaan bermakna antara rerata jumlah OBL kelompok OVX dengan kelompok OVX + IGD.
3. tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara rerata jumlah OBL kelompok OVX + IGD.

Tabel 4. Pengaruh IGD terhadap jumlah OKL

Kelompok Perlakuan	N	Jumlah OBL			Analisis
		\bar{x}	\pm	SD	
Normal	6	17	\pm	12	Anova (nilai p= 0,001)
OVX + IGD 0 mg/kg BB/hr	6	33	\pm	7	
OVX + IGD 15 mg/kg BB/hr	5	16	\pm	5	
OVX + IGD 30 mg/kg BB/hr	5	15	\pm	4	
OVX + IGD 60 mg/kg BB/hr	6	17	\pm	3	

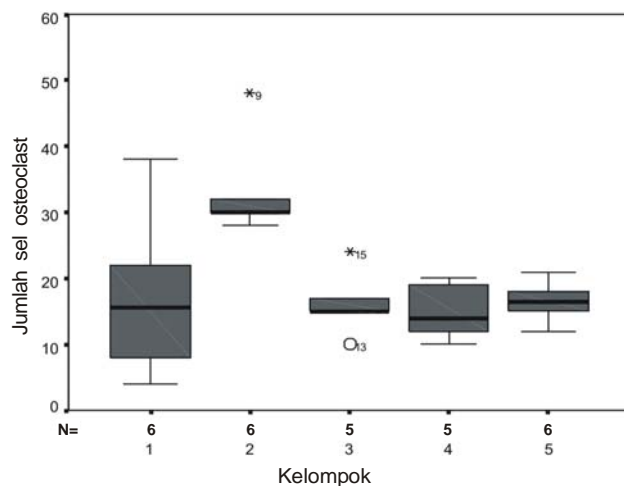


Diagram 2. Diagram Box plot untuk jumlah OKL.

OKL kelompok OVX + IGD lebih kecil dari kelompok OVX, namun mirip dengan kelompok normal.

Tabel 5. Kesimpulan uji perbandingan berganda LSD jumlah OKL

Perbandingan kelompok	P value	Kesimpulan
1 vs 2	0,001	Berbeda nyata
1 vs 3	0,829	Tidak berbeda nyata
1 vs 4	0,628	Tidak berbeda nyata
1 vs 5	0,876	Tidak berbeda nyata
2 vs 3	0,001	Berbeda nyata
2 vs 4	0,000	Berbeda nyata
2 vs 5	0,001	Berbeda nyata
3 vs 4	0,797	Tidak berbeda nyata
3 vs 5	0,946	Tidak berbeda nyata
4 vs 5	0,737	Tidak berbeda nyata

Berdasarkan Tabel 5 disimpulkan:

1. terdapat perbedaan signifikan antara rerata jumlah OKL kelompok normal dengan kelompok OVX.
2. tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata jumlah OKL kelompok normal dengan kelompok OVX + IGD.
3. tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata jumlah OKL kelompok OVX + IGD.
4. terdapat perbedaan signifikan antara rerata jumlah OKL kelompok OVX dengan kelompok OVX + IGD.

PEMBAHASAN

Pemberian IGD in vivo dalam penelitian ini meningkatkan jumlah OBL dan menurunkan jumlah OKL. Penemuan ini mendukung penelitian terdahulu yang dilakukan secara in vitro oleh Yamaguchi, 2002.¹⁶

Pengaruh isoflavone terhadap jumlah OBL secara in vitro telah diketahui. Genistein mampu mengikat reseptor estrogen β dalam OBL. Kandungan DNA dalam OBL meningkat secara bermakna dengan penambahan genistein atau daidzein, menggambarkan isoflavone menstimulasi proliferasi OBL. Isoflavone meningkatkan pula aktivitas fosfatase alkalin sebagai enzim petanda dalam diferensiasi OBL.^{11,16} Genistein diketahui mengikat estrogen *receptor* dalam OBL (Yamaguchi, 2002; Kuiper, et al, 1998).

Efek supresi genistein pada OKL tikus dapat berperan dalam induksi apoptosis yang dimediasi me-

kanisme Ca^{2+} signalling, inhibisi protein kinase dan aktivasi protein *tyrosine phosphatase* dalam sel.¹⁶

Blair et al., 1996 dengan OKL avian sebagai model, diberi genistein atau daidzein, menemukan inhibisi resorpsi tulang oleh genistein tetapi tidak oleh daidzein, mungkin karena efek inhibisi genistein terhadap tyrosine kinase C.¹⁷

Cho et al, 2002 dengan MG63 OBL sebagai model dan diterapi dengan genistein, daidzein, atau ekstrak etanol dari kedelai atau kacang hitam (*Rhynchosia molubilis*) dibandingkan dengan estradiol dan kontrol, menemukan peningkatan proliferasi sel dengan estradiol 63%, genistein 74%, daidzein 57%, ekstrak kacang kedelai 68%, dan ekstrak kacang hitam 76%. Ekstrak kacang hitam meningkatkan ekspresi *insulin-like growth factor I* mRNA dan respons estrogen elemen plasmid.¹⁸

KESIMPULAN

1. Pemberian IGD oral dari ekstrak *Pueraria Lobata* setiap hari selama 21 hari meningkatkan jumlah OBL *Rattus novvergicus Wistar hipoestrogen* dengan dosis IGD 30 mg/kg BB/hari menghasilkan jumlah OBL terbesar.
2. Pemberian IGD oral dari ekstrak *Pueraria Lobata* setiap hari selama 21 hari menurunkan jumlah OKL *Rattus novvergicus Wistar hipoestrogen* dengan dosis IGD 30 mg/kg BB/hari menghasilkan jumlah OKL terkecil.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan analisis ekstrak tokbi lebih rinci, tidak terbatas pada daidzein dan genistein.

RUJUKAN

1. Speroff L, Fritz MA. Menopause and the Perimenopausal Transition. In (Speroff L, Fritz MA ed.). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7th Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005; 621-88
2. Claude AD. Osteoporosis: Using bone markers for diagnosis and monitoring. *Geriatrics*. 1996; 51 (4): 24-30
3. Djoko RH. Diagnosis dini osteoporosis pada wanita menopause. Disertasi Unair. 1997; 5-6
4. Rahman IA. Modeling and remodeling tulang. Studi eksperimen pada macaca fascicularis yang hipoestrogenik. Disertasi UI. 1999; 18-23

5. Bjarnason NH, Christiansen C. Osteoporosis. In (Lauritzen C, Studd J ed). *Current Management of the Menopause*. 1st London: Taylor & Francis. 2005; 139-47
6. Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentration of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet*. 1998; 342: 1209-10
7. Adlercreutz H. Phytoestrogen. In (Lauritzen C, Studd J ed). *Current Management of the Menopause*. 1st London: Taylor & Francis. 2005; 271-80
8. Mazur W. Phytoestrogens in Food. In (Adlercreutz ed.) *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism: Phytoestrogens*, Bailliere Tindall, London. 1998; 12 (4): 729-40
9. Setchell KDR. Isoflavones — Benefits and Risks from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Journal of the American College of Nutrition*. 2001; 20 (90005): 354S-62S
10. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1999; 85: 47-51
11. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton CJ, Safe SH, Gustafsson J. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with ER- β . *J Endocrinology*. 1998; 139 (10): 4252-63
12. Hidajat A, Ali M, Kumalaningsih S, Priyoutomo E. Identifikasi dan Isolasi Isoflavone Non Kedele Tumbuhan Polong, Simposium Nasional Persatuan Menopause Indonesia dan Asia Pasifik, Menopause Federation, Jakarta. 2003
13. Figallo VB, Lin F, Kenworthy WJ, Giusti MM. The effect of Extraction Solvent on the Qualitative and Quantitative Recovery of Isoflavones from Soybean (*Glycine max*) Cultivars. 2002
14. Pangastuti EH. Analisa Komposisi Isoflavone dalam Daging dan Kulit Umbi Tebi (*Pueraria lobata*) dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Skripsi, MIPA Kimia Universitas Brawijaya Malang. 2002
15. David et al. Ovarian Hormones Modulate Endothelin 1 Vascular Reactivity and mRNA Expression in DOCA-Salt Hypertensive Rats, *Hypertension Journal*. 2001; 38: 692
16. Yamaguchi M. Isoflavone and bone metabolism: its cellular mechanism prevention role in bone loss. *Journal of Health Science*. 2002; 48 (3): 209-22
17. Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*. 1996; 61: 629-37
18. Cho Y. Black bean (*Rhynchosia molubilis*, Yak-Kong) exerts a prominent estrogenic effect on the proliferation of human MG-63 osteoblastic cells. *J Nutr*. 2002; 132: 614S